

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
13. Jg. 1975, S. 157–161

## Aktivitätsbestimmung und Normalwerte von L-Glutamat-L-Cystein- $\gamma$ -Ligase (EC 6.3.2.2) in menschlichen Erythrocyten; Glutathionbiosynthese V.<sup>1)</sup>

Von A. Wendel, G. Gumboldt und R. Hahn

Physiologisch-chemisches Institut (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel) der Universität Tübingen

(Eingegangen am 25. September 1974/17. Januar 1975)

Zur Aktivitätsbestimmung der Glutamat: Cystein- $\gamma$ -Ligase wurde eine Methode optimiert und eine neue Mikromethode entwickelt:

a) Aus  $^{14}\text{C}$ -markiertem Glutamat und Cystein synthetisiertes [ $^{14}\text{C}$ ]  $\gamma$ -Glutamylcystein wurde als Cadmiummercaptid gefällt und radiochemisch bestimmt.

b) Aus Glutamat und dem substratanalogen  $^{14}\text{C}$ -markierten  $\alpha$ -Aminobutyrat gebildetes  $\gamma$ -Glutamyl-[ $^{14}\text{C}$ ] Aminobutyrat wurde von nicht-umgesetztem Substrat papierelektrophoretisch getrennt und radiochemisch bestimmt.

Mit beiden Methoden wurde die Aktivität des Enzyms in menschlichen Erythrocyten bestimmt. Die Standardabweichung bei 20 Parallelbestimmungen betrug für Methode a  $\pm 9\%$ , für Methode b  $\pm 5\%$ . Die spezifische Aktivität des Enzyms in Erythrocyten von Erwachsenen wurde mit Methode a zu  $0,40 \pm 0,05$  U/g Hämoglobin und mit Methode b zu  $0,50 \pm 0,05$  U/g Hämoglobin ermittelt (n = 46).

### Assay and normal levels of L-glutamate: L-cysteine- $\gamma$ -ligase (E.C. 6.3.2.2) activity in human erythrocytes

For the determination of the activity of glutamate: cysteine- $\gamma$ -ligase one method was optimized and a new micromethod was developed:

a) Utilizing [ $^{14}\text{C}$ ]glutamate and cysteine as substrates, the product [ $^{14}\text{C}$ ]  $\gamma$ -glutamylcysteine was isolated as its cadmium mercaptide and determined by liquid scintillation counting.

b)  $\gamma$ -glutamyl-[ $^{14}\text{C}$ ]aminobutyrate, which was synthesized from glutamate and [ $^{14}\text{C}$ ]  $\alpha$ -aminobutyrate was separated from remaining radioactive substrate by paper electrophoresis and counted.

Both methods were used to determine the activity of the enzyme in human red blood cells. For 20 parallel determinations a standard deviation of  $\pm 9\%$  and  $\pm 5\%$  was obtained for method a and b, respectively. The specific activity of the enzyme in erythrocytes of adults was found to be  $0.40 \pm 0.05$  U/g hemoglobin with method a, and  $0.50 \pm 0.05$  U/g hemoglobin with method b.

Das Tripeptid Glutathion nimmt im Stoffwechsel des Erythrocyten eine zentrale Stellung ein. Seine Hauptfunktion wird gegenwärtig darin gesehen, die funktionelle Integrität der Zelle zu gewährleisten. Einige dabei wichtige Reaktionen seien kurz aufgezählt:

Schutz von Enzym- und Membran-SH-Gruppen (5, 6); Eliminierung von Peroxiden über das Glutathionperoxidase-System, dadurch Schutz ungesättigter Membranlipide (7); Aminosäuretransport in den Erythrocyten über den  $\gamma$ -Glutamylzyklus (8).

Da Glutathion weder in reduziertem noch in oxidiertem Zustand in den Erythrocyten eindringen kann (9), das Disulfid aber aktiv aus der Zelle transportiert wird (10), kommt der Glutathionbiosynthese im Erythrocyten als alleinigem Lieferanten des Tripeptids besondere Bedeutung zu. Sie verläuft weitgehend analog der Glutathionbiosynthese in Leber (11) und Hefe (12) und wird von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (1–3, 13–15, Übersicht in l. c. (16)).

Von besonderem Interesse sind die pathophysiologischen Phänomene, die bei einem verminderten intraerythrocytären Glutathionspiegel auftreten. Sie sind gekennzeichnet durch Neigung zu hämolytischen Krisen, mit Bildung von Heinz'schen Innenkörperchen: Ihr Ausmaß variiert allerdings stark und wird oft erst manifest, wenn der Erythrocyt durch zusätzliche oxidative Noxen, z. B. Arzneimittelmetabolite, Nahrungsbestandteile (etwa Inhaltsstoffe von *Vicia faba*) oder ionisierende Strahlen belastet wird. Derartige Symptome treten jedoch bei allen Enzymdefekten auf, die eine Verminderung des GSH-Spiegels zur Folge haben, so z. B. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel (17, 18) oder bei Störungen der Neusynthese (20–23). Die Differenzierung dieser möglichen Enzymdefekte ist schwierig, da Testmethoden angewandt werden, die entweder in biologischem Material ohne vorherige Reinigung nur unter Berücksichtigung besonderer Kautelen auszuführen sind (15) oder die Reinigung eines Hilfsenzym voraussetzen (24).

Nachdem aus unserem Arbeitskreis bereits eine Routine-Bestimmung der Glutathionsynthetase-Aktivität (EC 6.3.2.3) vorgeschlagen wurde (25), soll in vorliegen-

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (We 686/1).

der Arbeit über eine Bestimmungsmethode für  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase berichtet werden, die im Hämolyolat routinemäßig ausgeführt werden kann.

## Material und Methoden

ATP, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat-Kinase (spez. Aktivität 200 U/mg) wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen; Glutathion von den Papierwerken Waldhof-Aschaffenburg; Dithioerythrit und L- $\alpha$ -Aminobutyrate stammten von Serva, Heidelberg; 1,4-Di-2(5-phenyloxazol)benzol (POPOP), 2,5-Diphenyloxazol (PPO) von den Koch-Light-Laboratories, Bucks (England).

[U- $^{14}$ C] L-Glutaminsäure, spez. Aktivität 285 mCi/mmol, wurde von Buchler-Amersham, Braunschweig, und [3- $^{14}$ C] D,L- $\alpha$ -Aminobuttersäure, spez. Aktivität 10 mCi/mmol von Schwarz-Mann, Orangeburg (N. Y.), USA bezogen.

Die Papierelektrophorese wurde auf Whatman Papier Nr. 1 in einem Eigenbau-Gerät aus PVC mit Kühlblock, Elektrodenabstand 110 mm (Platin), durchgeführt. Ein ähnliches Gerät befindet sich im Handel.

Alle weiteren Substanzen waren p. a.-Substanzen der Firma Merck A.G., Darmstadt.

### Aktivitätsbestimmung Test a

#### Prinzip

Dem Enzym werden  $^{14}$ C-markiertes Glutamat, Cystein und ATP als Substrate angeboten. Das verbrauchte ATP wird aus Phosphoenolpyruvat mit Hilfe von Pyruvat-Kinase regeneriert. Entstandenes  $^{14}$ C-markiertes  $\gamma$ -Glutamylcystein wird als Cadmiummercaptid gefällt; Substrat und Produkt werden durch Dithioerythrit vor Oxidation geschützt. Zur quantitativen Fällung wird Glutathion als Mitfällungsreagenz zugesetzt. Der Niederschlag wird gewaschen, aufgelöst und zur Entfernung letzter Spuren von [ $^{14}$ C] Glutamat nochmals gefällt, anschließend wieder aufgelöst und im Flüssigkeitsszintillator ausgezählt.

### Durchführung

Die Komponenten des Testsystems werden in den in Tabelle 1 aufgeführten Volumenteilen und Konzentrationen eingesetzt.

Die Lösungen 1–6 werden in den angegebenen Volumenteilen 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Dann wird mit Lösung 7 gestartet. Nach 4 Minuten Inkubation wird mit Lösung 8 gestoppt. Ausgefallenes Protein wird 15 Minuten bei 2700 g abzentrifugiert. Vom proteinfreien Überstand werden 200  $\mu$ l entnommen und mit 2 ml Lösung 9 versetzt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l 0,77 mol/l NaOH wird ein pH von 7  $\pm$  0,2 erreicht, und die Mercaptide fallen aus. Nach Zentrifugieren wird der Überstand dekantiert und der Niederschlag in 2 ml Lösung 10 suspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wird nach erneutem Dekantieren des Überstandes der Niederschlag in 100  $\mu$ l Lösung 8 aufgelöst. Der Fällungsvorgang wird sinngemäß wiederholt, jedoch ohne GSH in Lösung 9, was zur Folge hat, daß zur Neutralisation 100  $\mu$ l 0,65 mol/l NaOH benötigt werden. Der gewaschene Niederschlag wird wieder mit 100  $\mu$ l Lösung 8 gelöst und quantitativ in 3 ml Dioxanzsintillator nach *Bray* (19) überführt und ausgezählt.

### Auswertung

Die enzymatische Aktivität wird in Internationalen Einheiten angegeben (1 U = 1  $\mu$ mol synthetisiertes  $\gamma$ -Glutamylcystein pro Minute im Ansatz). Die Syntheserate wird von der Menge des eingesetzten [ $^{14}$ C] Glutamat ausgehend berechnet, von dem unter den vorliegenden Bedingungen 9% für Verlust bei der Aufarbeitung und als Quenchkorrektur abgezogen werden müssen. Als Leerwert dient ein Inkubationsansatz ohne Enzym.

### Untersuchungen zum Testverlauf

a) Da das Substrat Cystein bei pH 7,4 rasch autoxydiert, wurde das Ausmaß der Autoxydation im Ansatz ohne Dithioerythrit zeitabhängig nach *Ellmann* (26) verfolgt.

b) Die Ausbeute an gefällttem Cadmiummercaptid wurde mit Glutathion als Testsubstanz polarographisch verfolgt (27). Aus der Konzentrationsabhängigkeit wurde die optimale Menge von

Tab. 1. Testsystem a zur Bestimmung der L-Glutamat-L-Cystein- $\gamma$ -Ligase-Aktivität

Lösung Nr.	Volumen [ $\mu$ l]	Substanz	Endkonzentration bzw. Menge pro Ansatz	Bemerkungen
1	20	Triäthanolamin-Puffer pH 7,5 Kaliumchlorid	91 mmol/l 64 mmol/l	
2	20	ATP Phosphoenolpyruvat	4,55 mmol/l 4,55 mmol/l	Di-Natrium-Salz, Dicyclohexyl- ammonium-Salz (auf pH 7 eingestellt)
3	20	0,8 U Pyruvat-Kinase	4 $\mu$ g	Kristallsuspension
4	20	[ $^{14}$ C] L-Glutamat	4,64 mmol/l; 0,22 $\mu$ Ci	
5	20	MgCl <sub>2</sub> Dithioerythrit	91 mmol/l 4,55 mmol/l	
6	100	Hämolyolat	50–100 g Protein/l	Erythrocyten vor Hämolyse 1 $\times$ mit 9 g/l NaCl gewaschen
7	20	L-Cystein · HCl	4,55 mmol/l	
8	200	Trichloressigsäure (100 g/kg)		
9	2000	Triäthanolamin-Puffer pH 7 CdCl <sub>2</sub> GSH	10 mmol/l 11 mmol/l 2 mmol/l	Fällungsreagenz
10	2000	Triäthanolamin-Puffer pH 7 CdCl <sub>2</sub>	10 mmol/l 5 mmol/l	Waschlösung

Tab. 2. Testsystem b zur Bestimmung der L-Glutamat-L-Cystein- $\gamma$ -Ligase-Aktivität.

Lösung Nr.	Volumen [ $\mu$ l]	Substanz	Endkonzentration bzw. Menge im Ansatz	Bemerkungen
1	20	Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 Glutamat MgCl <sub>2</sub> L- $\alpha$ -Aminobuttersäure	100 mmol/l 10 mmol/l 10 mmol/l 10 mmol/l	
2	10	ATP Phosphoenolpyruvat	5 mmol/l 5 mmol/l	auf pH 7 eingestellt
3	10	Pyruvat-Kinase 1 U	10 kU/l	
4	10	[ <sup>14</sup> C] D,L-Aminobutytrat	0,25 mmol/l; 0,25 $\mu$ Ci	
5	50	Hämolysat	100–150 g Protein/l	siehe Tabelle 1

GSH als Mitfällungsreagenz ermittelt, aus der pH-Abhängigkeit der optimale pH-Bereich für die Fällungsreaktion.

#### Aktivitätsbestimmung Test b

##### Prinzip

Dem Enzym werden als Substrate das substratanaloge <sup>14</sup>C-markierte  $\alpha$ -Aminobutytrat, unmarkiertes Glutamat und ATP angeboten. Verbrauchtes ATP wird regeneriert. Substrate und Produkte sind in diesem Fall nicht oxidabel. Sie werden papierelektrophoretisch getrennt und im Flüssigkeitsszintillator ausgezählt.

##### Durchführung

Die Komponenten des Testsystems sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Lösungen Nr. 1–4 werden 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert, die Reaktion wird durch Zugabe von 50  $\mu$ l ebenfalls vorinkubiertem Hämolysat gestartet. Nach max. 10 Minuten wird mit 10  $\mu$ l 1,5 mol/l Perchlorsäure gestoppt. Von dieser Lösung werden über dem ausgefallenen Protein 5  $\mu$ l Probe entnommen und auf 12 x 130 mm große Papierelektrophoresestreifen aufgetragen. Die Streifen werden vorher mit Elektrophoresepuffer angefeuchtet, vorgekühlt und müssen blasenfrei aufliegen. Die Probe wird 2 cm von der Mitte aus zur kathodischen Hälfte aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt 30 Minuten in 0,28 mol/l Natrium-Acetat pH 3,9, Feldstärke 50 V/cm bei einer Kühlwassertemperatur von 20 °C. Danach werden die Papierstreifen waagrecht liegend bei 120 °C getrocknet und in der Mitte zerschnitten. Auf der kathodischen Papierhälfte befindet sich Aminobutytrat, auf dem anodischen Teil neusynthetisiertes Glutamylaminobutytrat. Beide Hälften werden in je ein Scintillationsgläschen überführt, mit 100  $\mu$ l Szintillator (0,01 % POPOP, 0,40 % PPO in Toluol) befeuchtet und ausgezählt.

##### Auswertung

Als Einheit der Enzym-Aktivität wird 1 U = 1  $\mu$ mol synthetisiertes  $\gamma$ -Glutamylaminobutytrat/min im Ansatz definiert. Da verbleibendes Substrat und Produkt simultan gemessen werden, entfallen weitere Korrekturen. Als Nullwert dient ein Ansatz ohne Glutamat. Zu berücksichtigen ist, daß als radioaktives Substrat Racemat eingesetzt wird und die D-Form nicht verwertet wird. Damit entspricht der Umsatz von 1 % radioaktivem Aminobutytrat pro Minute 10 mU.

##### Bestimmung der Normalwerte im Hämolysat

Venöses heparinisiertes Blut von 45 Probanden (38  $\delta$ , 7  $\phi$ , Lebensalter 22–36 Jahre) wurde abzentrifugiert, 1 x mit 9 g/l NaCl gewaschen und im Verhältnis 1 : 1 mit dest. Wasser hämolyt. Die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase-Aktivität wurde mit Test a (Doppelbestimmungen, je 4 Minuten Inkubationszeit) und Test b (Dreifachbestimmungen, 3, 6, 9 Minuten Inkubationszeit) durchgeführt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Testsystem a

Die Umsatzrate war proportional der Enzymkonzentration bzw. der Menge an zugesetztem Hämolysat und bis zu 5 Minuten Inkubationszeit linear. Die Erfassungsgrenze liegt bei 3–4 mU pro Testansatz. Bei 20 Parallelbestimmungen betrug die Standardabweichung  $\pm$  9%. Die spezifische Aktivität der L-Glutamat-L-Cystein- $\gamma$ -Ligase ( $\pm$  Standardabweichung) betrug bei Erwachsenen 0,40  $\pm$  0,05 U/g Hämoglobin.

Der wesentliche Unterschied der hier beschriebenen Methode zu dem von Minnich et al. (15) publizierten Test besteht in der Durchführung der Fällung von  $\gamma$ -Glutamylcystein als Cadmium-Mercaptid. Die Untersuchung der Fällungsausbeute in Abhängigkeit vom pH zeigte, daß diese von 10% bei pH 4,0 steil ansteigt und bei pH 6,8–7,5 ein Plateau erreicht, bei dem 93%  $\gamma$ -Glutamylcystein oder Glutathion als Mercaptide ausfallen. Die von den zitierten Autoren beschriebene umständliche Titrationsprozedur auf pH 5,25 kann nicht empfohlen werden, da bei diesem Wert geringste pH-Schwankungen große Änderungen der Fällungsausbeute und damit des gemessenen Umsatzes hervorrufen. Ferner konnte durch die Einführung eines Umfällungs-Schrittes der durch mitgefälltes [<sup>14</sup>C] Glutamat verursachte hohe Nullwert um eine Zehnerpotenz gesenkt werden. Die dadurch erreichte höhere Empfindlichkeit gestattete, die Inkubationszeit von 1 Stunde auf 4 Minuten zu senken. Weiterhin erwies es sich als notwendig, ein ATP-regenerierendes System zu verwenden, da ADP eine starke Produkthemmung der Reaktion bewirkt (3).

Als Störungsmöglichkeit kommen in erster Linie alle oxidierenden Vorgänge in Frage. Dadurch wird nicht nur die Konzentration des Substrates Cystein herabgesetzt, sondern auch synthetisiertes  $\gamma$ -Glutamylcystein zum Disulfid oder höheren Oxidationsstufen des Schwefels oxidiert und damit der Fällung als Mercaptid entzogen. Im testanalogen Ansatz konnte gezeigt werden, daß nach 10 Minuten Inkubationsdauer 8% des Cysteins als Disul-

fid vorlagen. Obwohl das Enzym durch Dithioerythrit gehemmt wird (3), muß deshalb zum Oxidationsschutz bei einer zum Cystein mindestens stöchiometrischen Konzentration gearbeitet werden. Dies ist der Grund dafür, daß mit Testsystem a eine um etwa 20% niedrigere spezifische Aktivität als mit Testsystem b gefunden wurde, obwohl L-Cystein und L- $\alpha$ -Aminobutyrat mit etwa gleicher scheinbarer Maximalgeschwindigkeit vom Enzym umgesetzt werden (3, 16).

Als weitere Störfaktoren kommen Enzyme im Erythrocyten in Betracht, die Glutamat metabolisieren. Bei der angegebenen Inkubationsdauer von 4 Minuten bewirken jedoch geringe Änderungen der Glutamatkonzentration keine merklichen Änderungen der gemessenen Geschwindigkeit, weil weit über dem  $K_m$  (app)-Wert für Glutamat gearbeitet wird (3). Zudem sind die Produkte solcher Glutamat-metabolisierender Reaktionen sicherlich nicht als Mercaptide fällbar.

Als relevante Störung kommt die Anwesenheit von  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase im Erythrocyten (8) in Frage, die Glutamylcystein zu 5-Oxoprolin und Cystein spaltet. Da bisher kein spezifischer Hemmstoff für dieses Enzym bekannt ist, kann nur versucht werden, durch kurze Inkubationszeiten bei geringen absoluten Umsätzen zu verhindern, daß für dieses Enzym nennenswerte Mengen an Substrat akkumulieren. Eine endgültige Abschätzung dieser Konkurrenzreaktion kann jedoch erst erfolgen, wenn der  $K_m$ -Wert der  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase für  $\gamma$ -Glutamylcystein bekannt ist.

#### Testsystem b

Die Umsatzrate war linear mit der Zeit bis 20 Minuten und proportional der Menge an eingesetztem Hämolyat. Die Erfassungsgrenze des Tests liegt bei 10 mU pro Testansatz. Bei 20 Parallelbestimmungen betrug die Standardabweichung  $\pm 5\%$ . Die spezifische Aktivität der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase betrug bei 45 Erwachsenen  $0,50 \pm 0,05$  U/g Hämoglobin. Bei dieser neu entwickelten Methode wurden keinerlei Störungen beobachtet. Das Problem des Oxidationsschutzes entfällt, da mit

nichtoxidablen Substraten gearbeitet wird. Eine Regenerierung des verbrauchten ATP ist essentiell. Als kritischem Punkt muß der Temperaturkonstanz bei der Elektrophorese besondere Beachtung geschenkt werden.

Allgemein haben beide hier beschriebenen Testsysteme den Vorzug, das Produkt der Reaktion zu messen; dies bietet grundsätzlich höhere Sicherheit als die oft einfachere Messung des Substratverbrauchs. Der Arbeitsaufwand für beide Aktivitätsbestimmungen ist ungefähr gleich hoch, jedoch bedarf Test b nach unseren Erfahrungen einer etwas längeren Einarbeitung. Zudem werden in Test b geringere relative Umsätze gemessen (also prozentual ein geringerer Teil der angebotenen Radioaktivität eingebaut). Wir würden deshalb empfehlen, für Routinemessungen die Methode a, und für spezielle Differenzierungsprobleme die Methode b zu verwenden.

Die Anwendung beider Tests auf Hämolyat von 46 gesunden Erwachsenen zeigte, daß die Streuung der gemessenen Werte kaum über die Standardabweichungen der Methode hinausgingen. Dies heißt, daß die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase bei allen Probanden, unabhängig von Alter und Geschlecht, eine für ein Enzym außergewöhnlich konstante spezifische Aktivität aufweist. Dies ist um so bemerkenswerter, als die Aktivität dieses Enzyms als Regulator für die intrazelluläre GSH-Konzentration diskutiert wird (3, 14).

Daraus können zwei Schlüsse gezogen werden:

1. Eine abnormale Aktivität kann sehr leicht erkannt werden.
2. Möglicherweise wird die Glutathionbiosynthese nicht durch die beiden synthetisierenden Enzyme reguliert, sondern bereits auf einem niedrigeren Niveau, wie z. B. Transport oder Bereitstellung der Aminosäuren im Erythrocyten.

#### Danksagung

Herrn Professor Dr. L. Flohé sei für viele wertvolle Hinweise und Anregungen bei intensiven Diskussionen herzlich gedankt.

#### Literatur

1. Wendel, A., Schaich, E., Weber, U. & Flohé, L. (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 514–522.
2. Wendel, A. & Flohé, L. (1972), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 523–530.
3. Wendel, A. (1974) in „Symposium on Glutathione“ (L. Flohé, H. Ch. Benöhr, H. Sies, Waller, H. D. & A. Wendel, Eds.), S. 69–78, Thieme Verlag, Stuttgart.
4. Wendel, A. & Heinle, H. (1975), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 33–41.
5. Aebi, H. & Suter, H. (1974) in l. c. (3), pp. 192–201.
6. Kosower, N. S. & Kosower, E. M. (1974) in l. c. (3), pp. 216 bis 227.
7. Flohé, L. (1971), Klin. Wochenschr. 49, 669–683.
8. Palekar, A. G., Tate, S. S. & Meister, A. (1974), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 293–297.
9. Wendel, A. & Flohé, L. (1970), diese Z. 8, 441.
10. Srivastava, S. K. & Beutler, E. (1969), Biochem. J. 114, 833–837.
11. Snoke, J. E. & Bloch, K. (1955), J. Biol. Chem. 213, 825 bis 835.
12. Mooz, E. D. & Meister, A. (1967), Biochemistry 6, 1722 bis 1734.
13. Boivin, P., Galand, C. & Bernard, J. F. (1974) in l. c. (3), pp. 146–157.
14. Blume, K. G., Paniker, N. V. & Beutler, E. (1974) in l. c. (3), pp. 157–165.

15. Minnich, V., Smith, M. B., Brauner, M. J. & Majerus, P. W. (1971), *J. Clin. Invest.* 50, 507–513.
16. Meister, A. (1974) in „The Enzymes“ Bd. X, 3. Ausgabe (P. D. Boyer, Hrsg.), Academic Press, London und New York, pp. 671–697.
17. Löhr, G. W. & Waller, H. D. (1961), *Deut. Med. Wochenschr.* 86, 87–93.
18. Beutler, E. (1969), *Pharmacol. Rev.* 21, 73–103.
19. Bray, G. A. (1960), *Anal. Biochem.* 1, 279–285.
20. Boivin, P., Galand, C., André, R. & Debray, J. (1966), *Nouv. Rev. Franc. Hématol.* 6, 859–866.
21. Prins, H. K., Oort, M., Loos, J. A., Zürcher, C. & Beckers, T. A. (1966), *Blood* 27, 145–166.
22. Mohler, D. N., Majerus, P. W., Minnich, V., Hess, C. E. & Garrick, M. D. (1970), *New Engl. J. Med.* 283, 1253–1257.
23. Konrad, P. N., Richards, F. H., Valentine, W. N. & Paglia, D. E. (1972), *New Engl. J. Med.* 286, 557–561.
24. Orłowski, M. & Meister, A. (1971), *Biochemistry* 10, 372 bis 380.
25. Wendel, A. & Flohé, L. (1972) in „Fortschritte der Klinischen Chemie, Enzyme und Hormone“ (E. Kaiser, Hrsg.) S. 97–107, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien.
26. Ellmann, G. L. (1958), *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443 bis 450.
27. Wenck, H., Schwabe, E., Schneider, F. & Flohé, L. (1972), *Z. Anal. Chem.* 258, 267–272.

Dr. Albrecht Wendel  
74 Tübingen  
Hoppe-Seyler-Str. 1

